

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20760

研究課題名(和文) 類縁ウイルスによる多様な宿主因子依存性を診るシステムの開発

研究課題名(英文) Development of a system to diagnose diverse host factor dependence by analogous viruses.

研究代表者

田 鎌 修平 (Tagawa, Shuhei)

大阪大学・感染症総合教育研究拠点・特任准教授(常勤)

研究者番号：20513493

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,100,000円

研究成果の概要(和文)：DNA断片から簡便に感染性ウイルスを作成した。蛍光タンパク質融合PQC、具体的にはGFP融合Hsp70(14種)、DnaJ(50種)、NEF(15種)を個別に発現させたArrayedライブラリーを作成した。樹立したシャペロン/コシャペロン発現細胞をそれぞれフラビウイルスに感染させ、ウイルス感染によるシャペロンの細胞内局在、特にウイルスの増殖部位(タンパク質合成、RNA複製、粒子形成)への変化を経時的に追跡可能なシステムの構築を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界で病原性を示すほぼ全てのフラビウイルスを網羅することに成功した。また異常蛋白質により凝集するシャペロンおよびコシャペロンを同定できるシステムも樹立した。ウイルスのみならず癌や神経変性疾患の病態解明にもつながる貴重なリソースである。

研究成果の概要(英文)：Infectious viruses were created from DNA fragments in a simple manner. Arrayed libraries of fluorescent protein-fused PQCs, specifically GFP-fused Hsp70 (14 species), DnaJ (50 species), and NEF (15 species) were individually expressed. The established chaperone/co-chaperone expressing cells were infected with flaviviruses, respectively, to confirm the establishment of a system that can track the subcellular localization of chaperones due to virus infection, especially changes to the viral growth sites (protein synthesis, RNA replication, particle formation) over time.

研究分野：ウイルス学

キーワード：Hsp70 DnaJ フラビウイルス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

一般的にウイルス蛋白質は、1)短時間で高発現し、2)無数の変異を含み、3)複雑な高次構造体を形成するものが多いという点から、シャペロン要求性が高いと考えられる。加えてフラビウイルスの場合、蛋白質の多くが疎水性の高い膜蛋白質ということもシャペロンへの依存度を挙げる要因になりうる。現在までにウイルス複製におけるシャペロンそして、それに付随するコシャペロン群や他のシャペロン・分解経路との関与など、詳細な機能解析には至っていない。フラビウイルス属内の類縁ウイルスの蛋白質(増殖段階)がどのように Hsp70 ネットワークへ依存するかを比較することで、Hsp70 という多くの生物で保存されている普遍的シャペロンの機能がどのように細分化されているかを明らかにすることが可能となる。

### 2. 研究の目的

細胞の持つ蛋白質品質管理機構(Protein quality control machinery: PQC)は多種多様な蛋白質の恒常性維持に寄与するが、その冗長性と汎用性を支える分子基盤の全容はまだ明らかでない。本研究では宿主因子に対して依存性の強いウイルス属を PQC の“基質”と捉え、ウイルス増殖過程で動員される PQC を網羅的に解析し同定できるシステムを開発する。ウイルス属に共通の必須因子を同定し、広範囲なウイルスに効果的な阻害薬開発の一助を目指すものである。

### 3. 研究の方法

フラビウイルスを類縁ながら多様性を示すウイルスモデルとして、特に性状(宿主動物/媒介動物/臨床症状)が異なるウイルス十種程度を用いる。申請者の所属するラボでは DNA フラグメントから簡便に感染性ウイルスを作る手法が樹立されている。世界にも稀な、多種類のフラビウイルスライブラリを構築する。一方で機能の冗長性が高い Hsp70 関連シャペロンの包括的スクリーニングのために、蛍光蛋白質融合型 PQC のアレイト(Arrayed)ライブラリーの構築を目指す。具体的には GFP 融合型の Hsp70(14 種)、DnaJ(50 種)、NEF(15 種)を個別に発現する細胞を樹立する。樹立されたシャペロン/コシャペロン指示細胞群に各々フラビウイルスを感染させ、ウイルス感染によるシャペロン群の細胞内局在変動、特にウイルス増殖部位(蛋白合成、RNA 複製や粒子形成)への局在変動を経時的に追跡し、関連するシャペロン群の網羅的な同定を目指す。同定されたシャペロン因子群に関して、CRISPR-Cas9/shRNA のコンビーネーションにより、その PQC 群の包括的機能抑制を行いウイルス蛋白質/増殖の性状解析(再生か分解か)を行う。またシャペロンに対して、小分子による阻害(ATPase 活性阻害 etc)が期待できる場合、薬剤スクリーニングなどを行い、特異的な抗ウイルス薬開発の可能性を示す。

#### 4 . 研究成果

DNA 断片から簡便に感染性ウイルスを作成した。蛍光タンパク質融合 PQC、具体的には GFP 融合 Hsp70 ( 14 種 )、DnaJ ( 50 種 )、NEF ( 15 種 ) を個別に発現させた Arrayed ライブラリーを作成した。樹立したシャペロン / コシャペロン発現細胞をそれぞれフラビウイルスに感染させ、ウイルス感染によるシャペロンの細胞内局在、特にウイルスの増殖部位 ( タンパク質合成、RNA 複製、粒子形成 ) への変化を経時的に追跡可能なシステムの構築を確認した。世界で病原性を示すほぼ全てのフラビウイルスを網羅することに成功した。また異常蛋白質により凝集するシャペロンおよびコシャペロンを同定できるシステムも樹立した。ウイルスのみならず癌や神経変性疾患の病態解明にもつながる貴重なリソースである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mori Y, Sakata M, Sakai S, Okamoto T, Nakatsu Y, Taguwa S, Otsuki N, Maeda Y, Hanada K, Matsuura Y, Takeda M.	4. 巻 13
2. 論文標題 Membrane Sphingomyelin in Host Cells Is Essential for Nucleocapsid Penetration into the Cytoplasm after Hemifusion during Rubella Virus Entry.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mbio.01698-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shao H, Taguwa S, Gilbert L, Shkedi A, Sannino S, Guerriero CJ, Gale-Day ZJ, Young ZT, Brodsky JL, Weissman J, Gestwicki JE, Frydman J.	4. 巻 29
2. 論文標題 A campaign targeting a conserved Hsp70 binding site uncovers how subcellular localization is linked to distinct biological activities.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Chem. bio	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chembiol.2022.06.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tamura T, Torii S, Kajiwara K, Anzai I, Fujioka Y, Noda K, Taguwa S, Morioka Y, Suzuki R, Fauzyah Y, Ono C, Ohba Y, Okada M, Fukuhara T, Matsuura Y.	4. 巻 18
2. 論文標題 Secretory glycoprotein NS1 plays a crucial role in the particle formation of flaviviruses.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLoS Pathog	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.ppat.1010593	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shuhei Taguwa <sup>1,2</sup> , Hao-Shao <sup>3</sup> , Rahmi Dianty <sup>1</sup> , Chikako Ono <sup>1</sup> , Jason E. Gestwicki <sup>3</sup> , Judith Frydman <sup>2</sup> , and Yoshiharu Matsuura <sup>1</sup>
2. 発表標題 A campaign targeting a conserved Hsp70 binding site uncovers how subcellular localization is linked to distinct biological activities
3. 学会等名 the 44th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Shuhei Taguwa <sup>1,2</sup> , Hao-Shao <sup>3</sup> , Rahmi Dianty <sup>1</sup> , Chikako Ono <sup>1</sup> , Jason E. Gestwicki <sup>3</sup> , Judith Frydman <sup>2</sup> , and Yoshiharu Matsuura <sup>1</sup>
2. 発表標題 A campaign targeting a conserved Hsp70 binding site uncovers how subcellular localization is linked to distinct biological activities
3. 学会等名 The 68th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------